

B4

## Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien

**Publication number:** DE19530132

**Publication date:** 1997-02-20

**Inventor:** MUELLER OLIVER (DE); DEUTER RAINER DIPLO BIOL (DE)

**Applicant:** MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE)

**Classification:**

- **international:** C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68; C07H1/06; C07H21/00; G01N1/28; G01N33/50

- **European:** C12N15/10A2; C12Q1/68A4

**Application number:** DE19951030132 19950816

**Priority number(s):** DE19951030132 19950816

**Also published as:**



WO9707239 (A1)



EP0851937 (A1)



US6084091 (A1)



EP0851937 (A0)



CA2228769 (A1)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

### Abstract of DE19530132

The invention relates to a process for purifying, stabilising and/or isolating nucleic acids from biological materials, said process being characterized in that an adsorption matrix based on carbohydrates (e.g. potato flour) is added to a sample of biological materials containing nucleic acids in order to bind impurities.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ **Patentschrift**  
⑯ **DE 195 30 132 C 2**

⑯ Int. Cl. 6:  
**C 12 Q 1/68**  
G 01 N 33/50  
G 01 N 1/28  
C 07 H 21/00  
C 07 H 1/06

⑯ Aktenzeichen: 195 30 132.3-41  
⑯ Anmeldetag: 16. 8. 95  
⑯ Offenlegungstag: 20. 2. 97  
⑯ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 16. 7. 98

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften e.V., 14195 Berlin, DE

⑯ Vertreter:

II. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑯ Erfinder:

Müller, Oliver, Dipl.-Biochem. Dr., 44139 Dortmund,  
DE; Deuter, Reiner, Dipl.-Biol., 44309 Dortmund, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

Chemical Abstracts 78 (1973): 64341r, Martinson,  
H.G., Biochemistry 12 (1973) 139-145;  
Chemical Abstracts 77 (1972): 44986v, Vickers,  
J.D., Logan, D.M., Anal. Biochem. 48 (1972) 45-52;

⑯ Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien

⑯ Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Iso-  
lierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien,  
dadurch gekennzeichnet, daß man einer Nukleinsäuren  
enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine  
Adsorptionsmatrix zusetzt, die derart beschaffen ist, daß  
sie Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nuklein-  
säuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer  
Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reak-  
tionen hemmen, binden kann, und anschließend die Nukle-  
insäuren gegebenenfalls von gebundenen Verunreini-  
gungen trennt.

DE 195 30 132 C 2



DE 195 30 132 C 2

# DE 195 30 132 C 2

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung, Reinigung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien durch Entfernung von Verunreinigungen, z. B. von Nukleinsäuren schädigenden und enzymatischen Reaktionen hemmenden Substanzen. Dieses Verfahren ist insbesondere zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung von Nukleinsäuren in Stuhlproben geeignet. Weiterhin wird ein für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignetes Reagenzienkasten offenbart.

Zahlreiche Beispiele aus verschiedenen Forschungsbereichen belegen die Bedeutung der Analyse von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, die mit Substanzen verunreinigt sind, welche Nukleinsäuren während der Lagerung schädigen und eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z. B. durch Amplifikation hemmen. Daher ist es für die Brauchbarkeit der in den biologischen Materialien enthaltenen Nukleinsäuren für weitere Analysen wichtig, daß diese Substanzen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden sind oder gänzlich aus der Probe entfernt werden.

Eine besondere Bedeutung besitzt die Analyse von Nukleinsäuren aus fäkalen Proben. Die medizinische Hauptanwendung ist der Nachweis tumorspezifischer Veränderungen von nuklearer DNA aus Stuhl, die als Parameter bei der Frühdagnostik von Tumoren des Verdauungstrakts dienen können.

Eine Methode zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Stuhl wird in WO 93/20235 offenbart. Diese Methode ergibt jedoch nur geringe Ausbeuten an Nukleinsäuren. Weiterhin werden DNA-schädigende oder/und PCR-hemmende Substanzen nicht abgetrennt. Daher kann die isolierte DNA nicht über längere Zeit gelagert werden und eine Amplifikation zur Vernehrung spezifischer, zu analysierender Gienabschnitte dieser DNA liefert keine reproduzierbaren Ergebnisse. Ein besonderer schwerwiegender Nachteil des bekannten Verfahrens besteht darin, daß bei der PCR-Amplifikation keine intakten DNA-Fragmente mit einheitlicher Sequenz entstehen, die für eine weitere Analyse notwendig sind. Um diese zu erhalten, ist eine aufwendige Klonierung der amplifizierten Genabschnitte notwendig. Noch ein weiterer Nachteil des Verfahrens des Standes der Technik besteht darin, daß die stark gesundheitsschädigenden Lösungsmittel Phenol und Chloroform verwendet werden müssen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Aufgabe war somit die Bereitstellung eines Verfahrens, mit dem Nukleinsäuren in biologischen Materialien gegen Abbau stabilisiert und bei dem die enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren hemmende Substanzen abgetrennt werden können. Insbesondere soll ein Verfahren bereitgestellt werden, das eine zuverlässige Isolierung von DNA aus fäkalen Proben ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen zusetzt und anschließend die Nukleinsäuren gegebenenfalls von gebundenen Verunreinigungen abtrennt.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann die Brauchbarkeit von aus biologischen Materialien isolierten Nukleinsäuren, insbesondere DNA, deutlich verbessert werden. Weiterhin werden durch den Zusatz der Adsorptionsmatrix sowohl Nukleinsäuren schädigende als auch die enzymatische Manipulation betreuende Substanzen weitgehend abgetrennt. Die durch das erfindungsgemäße Verfahren stabilisierten Nukleinsäuren können daher über längere Zeit gelagert werden. Darüber hinaus werden bei einer Amplifikation der durch Zusatz einer Adsorptionsmatrix behandelten Nukleinsäuren, z. B. durch PCR, reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Diese Reproduzierbarkeit ist essentiell für die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse bei der Nukleinsäure-Analyse. Die hohe Qualität der durch das erfindungsgemäße Verfahren gereinigter Nukleinsäuren zeigt sich beispielsweise darin, daß sie direkt durch Sequenzierung oder Heteroduplexanalyse untersucht werden können. Eine Klonierung ist nicht notwendig. Außerdem müssen beim erfindungsgemäßen Verfahren keine gesundheitsschädigenden Lösungsmittel eingesetzt werden.

Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Adsorptionsmatrix ist derart beschaffen, daß sie Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nukleinsäuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reaktionen hemmen, wie etwa Abbauprodukte von Hämoglobin, z. B. Bilirubin, oder/und Gallensäuren oder Salze davon, binden kann. Vorzugsweise verwendet man eine unlösliche Adsorptionsmatrix, da in diesem Fall eine leichtere Abtrennung von der Probe möglich ist.

Gute Ergebnisse werden mit einer Adsorptionsmatrix auf Basis von Kohlenhydraten oder/und Polypeptiden erhalten. Bevorzugt ist eine Adsorptionsmatrix auf Basis von Kohlenhydraten, z. B. eine Adsorptionsmatrix, die Polysaccharide enthält. Besonders bevorzugt verwendet man eine Adsorptionsmatrix, die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate enthält, z. B. Stärke, Cellulose, Derivate von Stärke und Cellulose oder Mischungen davon.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung von Mehle, d. h. in wesentlichen einer Mischung von Cellulose, Stärke, Lipiden und Salzen oder Bestandteilen daraus. Als geeignet haben sich beispielsweise Mehle aus Getreide, Mais, Erbsen, Soja und Kartoffeln oder Bestandteile daraus bzw. Mischungen davon, erwiesen. Für einen Fachmann ist es selbstverständlich, daß neben den genannten Mehlsorten auch andere Mehlsorten bzw. Mischungen von mehreren Mehlsorten oder Bestandteilen daraus eingesetzt werden können. Am meiste bevorzugt ist die Verwendung von Kartoffelmehl oder Bestandteilen daraus.

Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung einer Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis zusammen mit löslichen Bestandteilen aus Mehl, insbesondere aus einer oder mehreren der obengenannten Mehlsorten.

Die Menge, in der die Adsorptionsmatrix der biologischen Probe zugesetzt wird, hängt im wesentlichen von der Beschaffenheit der Probe, d. h. der Menge an Verunreinigungen, ab. Gute Ergebnisse wurden erhalten, wenn man die Adsorptionsmatrix in einem Gewichtsanteil von 0,05 : 1 bis 100 : 1 bezüglich der Nukleinsäuren enthaltenden Probe verwendet. Besonders bevorzugt wird die Adsorptionsmatrix in einer Menge von 0,1 : 1 bis 10 : 1 zugesetzt.

Die Nukleinsäuren enthaltende Probe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren stabilisiert werden soll, stammt aus biologischen Materialien, die Nukleinsäuren abbauende bzw. enzymatische Reaktionen hemmende Verunreinigungen enthalten. Vorzugsweise stammt die Nukleinsäuren enthaltende Probe aus Fäkalien. Sie kann jedoch auch beispielsweise aus anderen Quellen, z. B. Geweben jeder Art, Knochenmark, humaner und tierischen Körperfüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Spermia, Cerebrospinalflüssigkeit, Sputum und Abstrichen, Pflanzen, Pflanzenteilen und -extrakten,

## DE 195 30 132 C 2

z. B. -säften, Mikroorganismen wie Bakterien, fossilen Proben, Bodenproben, Klärschlamm, Abwässern und Lebensmitteln stammen. Als Verunreinigungen können beispielsweise Abbauprodukte von Hämoglobin oder/und Gallensäuren oder Salze davon, aber auch andere Arten von Verunreinigungen enthalten sein.

Zur besseren Handhabung des Verfahrens hat es sich als günstig erwiesen, die Probe aus biologischen Materialien vor dem Zusatz der Adsorptionsmatrix in einer Pufferlösung aufzunehmen. Die Inkubation der Probe mit der Adsorptionsmatrix kann bei Raumtemperatur erfolgen. Die Inkubationsdauer kann in weiten Bereichen variiert werden. Nach der Inkubation kann die Adsorptionsmatrix z. B. durch Zentrifugation von der Probe abgetrennt werden.

Die Behandlung mit der Adsorptionsmatrix führt zu einer signifikanten Stabilitätszähmung der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren und bei einer anschließenden Isolierung der Nukleinsäuren zu einer besseren Reproduzierbarkeit. Dies gilt insbesondere, wenn sich an die Isolierung eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren, z. B. eine Amplifikation oder/und eine Restriktionsspaltung anschließt. Besonders bevorzugt wird die Amplifikation, z. B. durch PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Base Specific Amplification) oder 3SR (Self Sustained Sequence Replication) durchgeführt.

Ein besonders bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Analyse, der Nachweis oder die Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, aus Stuhlproben. Durch das erfundungsgemäße Verfahren sind saubere und amplifizierbare Nukleinsäuren aus fäkalen Proben erhältlich, die zum Nachweis von Mutationen, insbesondere von tumorspezifischen DNA-Mutationen verwendet werden können.

Das erfundungsgemäße Verfahren besitzt große Bedeutung für die Tumordiagnostik, da es den spezifischen Nachweis nukleärer eukaryotischer Nukleinsäuren in Gegenwart von Verunreinigungen und großer Mengen an bakteriellen Nukleinsäuren ermöglicht.

Durch Analyse von Stuhl-DNA unter Anwendung des erfundungsgemäßen Verfahrens können Tumoren des Verdauungstrakts, insbesondere Pankreas- oder Darmtumoren, früher und genauer diagnostiziert werden. Diese Diagnose erfolgt beispielsweise durch Untersuchung von Onkogenen oder/und Tumorsuppressoren auf tumorspezifische DNA-Mutationen. Da Zellen von Tumoren des Verdauungstraktes laufend in den Stuhl abgeschieden werden, ist eine Detektion von tumorspezifischen DNA-Mutationen im Stuhl durch das erfundungsgemäße Verfahren möglich.

Im Gegensatz zum einzigen, aus dem Stand der Technik bekannten nicht-invasiven Routinetest auf kolorektale Tumoren, dem Test auf okkultes Blut im Stuhl, kommt es beim erfundungsgemäßen Verfahren nicht bzw. nur sehr selten zu falsch-positiven Ergebnissen.

Darüber hinaus ermöglicht der Nachweis von Mutationen in Genen, die schon im Adenomstadium, d. h. in einem sehr frühen Stadium der Tumorprogression mutieren, eine deutlich frühere und spezifischere Diagnose als der Stuhl-Bluttest. Als geeignete Objekte der Mutationsanalysen können insbesondere das Tumorsuppressor-Gen APC (Adenomatose Polyposis Coli) (Fearon und Vogelstein (1990), Cell 61, 759-761) und das ras-Onkogen verwendet werden. Durch Mutationsanalysen dieser beiden Gene in DNA aus Stuhlproben können insbesondere Darmtumoren, z. B. Dickdarmtumoren, und Pankreastumoren erfaßt werden. Neben dem APC-Gen und dem ras-Gen können natürlich auch weitere tumorrelevante Gene für die Krebsdiagnose als Analyseobjekte dienen.

Eine weitere wichtige Anwendung für die erfundungsgemäße Isolierung von DNA aus fäkalen Proben sind zoobiologische populationsgenetische, evolutionsgenetische und botanische Studien und Untersuchungen von Tieren und Pflanzen. Bisher sehr selten durchgeführte Untersuchungen sehr häufig an der Seltenheit einer Tiere und der geringen Wahrscheinlichkeit, die betreffenden Tiere an einem bestimmten Ort zu treffen. Bei Kenntnis des ungefähren Aufenthaltsortes kann eine Analyse von zurückgelassenen Fäkalien durch das erfundungsgemäße Verfahren wichtige Hinweise auf den Verwandschaftsgrad der Tiere, auf zurückgelegte Wanderungswege oder auf die Nahrungsgewohnheiten der Tiere liefern. Ebenso können aus der Analyse fäkaler Nukleinsäuren, z. B. durch Nachweis mikrobieller oder viraler Nukleinsäuren, wichtige diagnostische Informationen über Infektionen, z. B. bakterieller oder viral Art abgeleitet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Stabilisierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, umfassend:

- (a) einen zur Aufnahme einer Nukleinsäure enthaltenden Probe geeigneten Puffer und
- (b) eine Adsorptionsmatrix zur Bindung von Verunreinigungen aus den biologischen Materialien, die derart beschaffen ist, daß sie Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nukleinsäuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reaktionen hemmen, binden kann.

Verzugsweise enthält das Reagenzienkit zusätzliche Mittel zur Reinigung von Nukleinsäuren, die z. B. mineralische und/oder organische Träger sowie gegebenenfalls Lösungen, Hilfsstoffe oder/und Zubehör umfassen. Mineralische Bestandteile von Trägern können beispielsweise poröse oder nicht-poröse Metalloxide oder Metallmischoxide, z. B. Aluminiumoxid, Titanoxid oder Zirkoniumdioxid, Silicagele, Materialien auf Basis von Glas, z. B. modifizierte oder nicht-modifizierte Glaspartikel oder Glasmehl, Quarz, Zeolith oder Mischungen von einer oder mehreren der obengenannten Substanzen sein. Andererseits kann der Träger auch organische Bestandteile enthalten, die z. B. aus gegebenenfalls mit funktionellen Gruppen modifizierten Latexpartikeln, synthetischen Polymeren, wie etwa Polyäthylen, Polypropylen, Polyvinylidenuorid, insbesondere ultrahochmolekularem Polyäthylen oder HD-Polyäthylen, oder Mischungen von einer oder mehreren der zuvor genannten Substanzen ausgewählt werden.

Der Träger kann beispielsweise in Form von Partikeln mit einer mittleren Größe von 0,1 µm bis 1000 µm vorliegen. Bei Verwendung eines porösen Trägers ist eine mittlere Porengröße von 2 µm bis 1000 µm bevorzugt. Der Träger kann beispielsweise in Form loser Schüttungen von Partikeln, Filterschichten, z. B. aus Glas, Quarz oder Keramik, Membranen, z. B. Membranen, in denen ein Silicagel angeordnet ist, Fasern oder Geweben aus mineralischen Trägern, wie etwa Quarz oder Glaswolle sowie in Form von Latices oder Frittenmaterialien aus synthetischen Polymeren vorliegen.

Weiterhin kann das Reagenzienkit auch noch geeignete Lösungen, z. B. Waschlösungen oder Pufferlösungen zur Aufnahme der Probe enthalten. Ein zur Aufnahme einer Nukleinsäure enthaltenden Probe geeigneter Puffer ist beispielsweise ein Puffersystem auf Basis von Tris-HCl pH 8.5, EDTA und gegebenenfalls NaCl. Ein besonders bevorzugter

## DE 195 30 132 C 2

Puffer, insbesondere zur Aufnahme von Stuhlproben, enthält 500 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM EDTA und 10 mM NaCl. Außerdem kann das erfundungsgemäße Reagenzienkit auch Hilfsstoffe wie Enzyme und andere Mittel zur Manipulation von Nukleinsäuren enthalten, z. B. mindestens einen Amplifikationsprimer und zur Amplifikation von Nukleinsäuren geeignete Enzyme, z. B. eine Nukleinsäurepolymerase oder/und mindestens eine Restriktionsendonuklease.

5 Die Primer zur Amplifikation von Nukleinsäuren stammen zweckmäßigerweise aus den zu analysierenden Genen, d. h. beispielsweise aus Onkogenen oder/und Tumorsuppressoren. Zur Amplifikation von Nukleinsäuren geeignete Enzyme und Restriktionsendonukleasen sind bekannt und kommerziell erhältlich.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden.

10

### Beispiel

#### Analyse von DNA aus Stuhlproben

15 Es wurden folgende Adsorptionsmatrizen getestet: Immobilisiertes Rinderserum-Albumin (RSA), Cellulose und Kartoffelstärke (alle von Sigma, München, DE) und Kartoffelmehl (Flonig, Postbus 45, 1540 AA Koog a/d Zaan, NL), bei dem es sich im wesentlichen um eine entölige Mischung aus Cellulose, Stärke, Lipiden und Salzen handelt.

16 Menschliche Stuhlproben wurden gesammelt, eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. 200 mg Stuhl wurden in 600 µl Stuhl-Lösungspuffer (SLP: 500 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM EDTA, 10 mM NaCl) homogenisiert. Zu jeweils 1/4 des Homogenats wurden 200 µl SLP mit 100 µg der jeweiligen Adsorptionsmatrix gegeben. Die Mischung wurde heftig vermischt und zweimal bei 500 × g bzw. 13000 × g für jeweils 5 min zur Präzipitation von Bakterien und anderen Verunreinigungen zentrifugiert. Nach Behandlung des klaren Überstands mit Proteinase K in einer Konzentration von 2,5 mg/ml wurde die DNA unter Verwendung einer DNA-Spinsäule (Qiagen, Hilden, DE) gereinigt, die zur DNA-Reinigung aus Blut und Gewebe geeignet ist. Die Säulenbeladung und Waschschritte werden wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt.

20 25 Die DNA wurde dann aus der Spinsäule in einem Endvolumen von 150 µl destillierten Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute an chromosomaler DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

26 Alle Präparationen zeigten vergleichbare Gesamt-DNA-Mengen von 15-20 µg. Auf einem analytischen Agarosegel waren keine Unterschiede zwischen der genetischen DNA aus Präparationen mit und ohne Adsorptionsmatrix zu erkennen. Durch Zugabe der Adsorptionsmatrix wurde auch keine Erhöhung in der Ausbeute der extrahierten chromosomal DNA festgestellt.

30 Zum Test der Stabilität der isolierten Nukleinsäuren wurde die DNA nach einwöchiger Aufbewahrung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Die stabilsten DNA-Proben wurden nach Verwendung von Kartoffelmehl als Adsorptionsmatrix erhalten.

35 Für die Amplifizierung durch PCR wurden 3 µl der gereinigten chromosomal DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl verwendet, das 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 µM jeweils dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 400 nM jedes Primers, 100 µg/ml RSA und 0,75 Einheiten Taq-Polymerase (AGS, Heidelberg, DE) enthielt.

40 Zur Sensitivitätsbesserung wurden Nested-PCR-Methoden (vgl. Jackson et al., (1991), in McPherson, N.J. Quirke, P. Taylor, G.R. (Hrsg.), PCR-A Practical Approach, Oxford University Press) unter Verwendung von Biotin-markierten Nested-Primern durchgeführt. Eine PCR von in Abwesenheit einer Adsorptionsmatrix gereinigten DNA-Proben war vollständig blockiert. Durch Zusatz von RSA, Cellulose oder Kartoffelstärke als Adsorptionsmatrix konnten teilweise reproduzierbare PCR-Ergebnisse erhalten werden (Tabelle 1).

45 Reproduzierbare PCR-Ergebnisse in allen zehn analysierten Proben wurden bei Verwendung von Kartoffelmehl als Adsorptionsmatrix erhalten. Die PCR-Fragmente waren zur Verwendung bei der Heteroduplexanalyse und auch zur direkten Sequenzierung geeignet. Hierzu erfolgte eine Präparation von einzelsträngiger DNA unter Verwendung von Streptavidin-gekoppelten Magnetbeads (Dynal, Hamburg, DE) gemäß den Angaben des Herstellers.

50

55

60

65

# DE 195 30 132 C 2

TABELLE 1: Eigenschaften von nukleärer DNA aus Stuhl

Matrix	Verlust <sup>a</sup>	PCR <sup>b</sup>	
-	80 %	0	
RSA	60 %	3	10
Cellulose	60 %	4	
Kartoffelstärke	60 %	4	
Kartoffelmehl	< 5 %	10	15

<sup>a</sup> Der DNA-Verlust durch Abbau wurde nach Aufbewahrung für 1 Woche bei - 20°C durch analytische Agarosegelektrophorese und spektrophotometrische Analyse gemessen.

<sup>b</sup> Es wurde eine PCR von DNA aus zehn verschiedenen Stuhlproben durchgeführt. Es ist die Anzahl von Proben angegeben, die durch PCR analysierbar waren.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung, Stabilisierung oder/und Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, dadurch gekennzeichnet, daß man einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe aus biologischen Materialien eine Adsorptionsmatrix zusetzt, die derart beschaffen ist, daß sie Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nukleinsäuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reaktionen hemmen, binden kann, und anschließend die Nukleinsäuren gegebenenfalls von gebundenen Verunreinigungen trennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis zusetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix zusetzt, die  $\alpha$ - oder/und  $\beta$ -glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate enthält.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix verwendet, die Stärke, Cellulose oder Mischungen davon enthält.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Adsorptionsmatrix ein Mehl aus Getreide, Linsen, Mais, Soja, Kartoffeln oder Bestandteile daraus oder Mischungen davon verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Kartoffelmehl oder Bestandteile daraus verwendet.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Adsorptionsmatrix auf Kohlenhydratbasis zusammen mit löslichen Bestandteilen aus Mehl verwendet.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß man die Adsorptionsmatrix in einem Gewichtsanteil von 0,05 : 1 bis 100 : 1 bezüglich der Nukleinsäuren enthaltenden Probe zusetzt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe aus Gewebea, Knochenmark, Körperflüssigkeiten, Pflanzen, Pflanzenteilen und -extrakten, Mikroorganismen, fossilen Proben, Bodenproben, Klärschlamm, Abwässern, Fäkalien und Lebensmitteln stammt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe als Verunreinigungen Substanzen mit Nukleinsäuren schädigender oder/und enzymatische Reaktionen hemmender Wirkung enthält.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren enthaltende Probe als Verunreinigungen Abbauprodukte von Hämoglobin oder/und Gallensäuren oder Salze davon enthält.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe aus biologischen Materialien vor dem Zusatz der Adsorptionsmatrix in einer Pufferlösung aufnimmt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sich an die Isolierung eine enzymatische Manipulation der Nukleinsäuren anschließt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Manipulation eine Amplifikation

## DE 195 30 132 C 2

oxer/und eine Restriktionspaltung umfaßt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation durch PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Base Specific Amplification) oder 3SR (Self Substained Sequence Replication) erfolgt.
16. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-15 zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Stuhlproben.
17. Verwendung nach Anspruch 16 zum Nachweis von DNA-Mutationen.
18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17 zur Analyse, zum Nachweis oder zur Isolierung nuklearer eukaryontischer Nukleinsäuren.
19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Diagnostik von Tumoren des Verdauungstrakts, insbesondere von Pankreas- oder Darmtumoren.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet daß man Onkogene oder/und Tumorsuppressorgene untersucht.
21. Verwendung nach Anspruch 18 zur Untersuchung von Tieren und Pflanzen.
22. Verwendung nach Anspruch 16 zum Nachweis mikrobieller oder viraler Nukleinsäuren.
23. Verwendung nach Anspruch 22 zur Diagnostik bakterieller und viraler Infektionen.
24. Reagenzienkit zur Reinigung und Stabilisierung von Nukleinsäuren aus biologischen Materialien, umfassend:
  - (a) eiseln zur Aufnahme einer Nukleinsäuren enthaltenden Probe geeigneten Puffer und
  - (b) eine Adsorptionsmatrix, die derart beschaffen ist, daß sie Verunreinigungen, die zur Schädigung von Nukleinsäuren führen oder/und die Durchführung enzymatischer Reaktionen verhindern oder/und enzymatische Reaktionen hemmen, binden kann.
25. Reagenzienkit nach Anspruch 24, zusätzlich umfassend Mittel zur weiteren Reinigung von Nukleinsäuren.
26. Reagenzienkit nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur weiteren Reinigung von Nukleinsäuren mineralische oder/und organische Träger sowie gegebenenfalls Lösungen, Hilfsstoffe oder/und Zubehör umfassen.
27. Reagenzienkit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger mineralische Bestandteile aus porösen oder nicht-porösen Metalloxiden oder Metalimischoxiden, Silicagelen, Materialien auf Basis von Gläsern oder Quarz, Zeolithen oder Mischungen davon enthält.
28. Reagenzienkit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger organische Bestandteile aus gegebenenfalls modifiziertem Latex, synthetischen Polymeren oder Mischungen davon enthält.
29. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 26-28, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger in Form von Partikeln mit einer mittleren Größe von 0,1 µm bis 1000 µm vorliegt.
30. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 26-29, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger Poren mit einer mittleren Größe von 2 µm bis 1000 µm aufweist.
31. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 26-29, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger in Form loser Schüttungen von Partikeln, Filterseebichten, Membranen, Geweben, Fasern oder Fritten vorliegt.

40

45

50

55

60

65